

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：81103  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18K05378  
研究課題名（和文）土壌に蓄積するscyllo-イノシトールリン酸の動態に関わる微生物学的要因の解明  
  
研究課題名（英文）Microbiological factors contributing to the dynamics of scyllo-inositol phosphates accumulated in soil  
  
研究代表者  
海野 佑介（Unno, Yusuke）  
  
公益財団法人環境科学技術研究所・環境影響研究部・研究員  
  
研究者番号：00522020  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：イノシトール6リン酸（IP6）は、土壌蓄積有機態リンの主要形態であり、リン利用効率を低下させる主要因の一つである。土壌中においてIP6は、myo-IP6とscyllo-IP6という2つの光学異性体として存在するが、これまでscyllo-IP6の動態に関与する微生物学的要因は明らかになっていなかった。そこで本研究では、scyllo-IP6資化性土壌細菌を単離し、その機能を解析することにより、土壌における資化性細菌の分布及び分解機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
持続可能性の高い農業生産方式の導入を求める社会的要望から、有機質リン肥料の活用や土壌蓄積リンの再利用を推奨する志向がみられる。本研究で得られた土壌蓄積有機態リンの主要形態であるscyllo-IP6の動態に関する微生物学的要因に関する知見は、将来の持続可能性の高い農業生産方式の確立に寄与する物である。

研究成果の概要（英文）：Inositol 6-phosphates (IP6) is the major form of soil-accumulated organic phosphorus and is one of the main factors that reduce phosphorus utilization efficiency in soil. IP6 exists in soil as two optical isomers, myo-IP6 and scyllo-IP6, but the microbiological factors involved in the dynamics of scyllo-IP6 have not been clarified. In this study, we isolated scyllo-IP6-utilizing soil bacteria and analyzed their functions to elucidate the distribution and degradation mechanisms of the bacteria in soil.

研究分野：土壌肥料学

キーワード：イノシトールリン酸資化性細菌 土壌リン循環 光学異性体 土壌微生物 フィチン酸 根圏イメージング メタゲノム メタゲノミクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

リンは植物の三大栄養素の一つであり、農業では収量を安定させるためにリン酸質肥料が投入されている。リン酸質肥料は、有限資源であるリン鉱石から、多くのエネルギーを用いて生産される。しかし、リン酸質肥料の利用効率は、他の肥料養素に比べて極端に低いと、土壌に蓄積するとともに、表層土壌の流出により水系に深刻な環境汚染を引き起こすことが懸念されている。

こうしたリン酸質肥料の利用効率が低い原因としては、土壌中に存在するリンの大部分が、植物が直接吸収し、利用可能な可給態リン酸ではなく、そのままでは利用できない不可給態リンとして存在するためであると考えられている。不可給態リンが高い割合を占める理由の一つとしては、土壌中に存在するリンの3~80%が、植物が直接には吸収利用できない有機態リンとして存在することが挙げられる。特に、イノシトール6リン酸 (IP<sub>6</sub>) は、土壌蓄積型有機態リンの主要形態であり、中性から酸性土壌ではアルミニウムや鉄と難溶性の塩を形成し、高い安定性を示す。そのため IP<sub>6</sub> は、土壌中におけるリン循環を阻害し、作物によるリン利用効率を低減させた主要因として問題視されている。

これまでもリン利用効率改善の観点から、IP<sub>6</sub> の動態に関する研究が行われ、IP<sub>6</sub> の分解を促進する様々な改善策が作出されてきた。しかし、既存の研究は、植物遺体に由来する *myo*-イノシトール6リン酸 (*myo*-IP<sub>6</sub>、フィチン酸) のみを対象として行われてきた。一方で、土壌中には *myo*-IP<sub>6</sub> の光学異性体である *scyllo*-イノシトール6リン酸 (*scyllo*-IP<sub>6</sub>) が *myo*-IP<sub>6</sub> と同様に蓄積していることが報告されてきた (Turner 2004)。

近年、*myo*-IP<sub>6</sub> の蓄積が見られず *scyllo*-IP<sub>6</sub> のみが蓄積している土壌が報告された (Cheesman 2014)。また英国ローザムステッド研究所の長期連用試験圃場を用いた研究から、*scyllo*-IP<sub>6</sub> や *myo*-IP<sub>6</sub> は、草地土壌で蓄積し、休閑地土壌では1/3程度まで存在量が減少すること、また *scyllo*-IP<sub>6</sub> の存在割合が、草地土壌では *myo*-IP<sub>6</sub> と同程度まで高まるが、休閑地土壌では存在割合が1/2程度まで低下することなどが示されてきた (Neal 2017)。

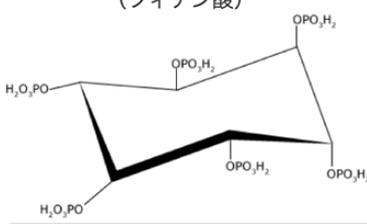
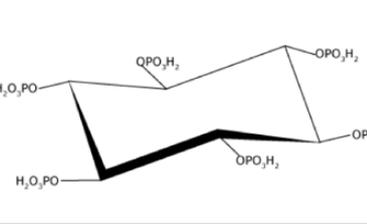
*scyllo*-IP<sub>6</sub> の動態に関わる生物学的要因調査は、小麦由来のフィターゼ (*myo*-IP<sub>6</sub> 脱リン酸酵素) による *scyllo*-IP<sub>6</sub> 分解試験のみであり、その結果は、*scyllo*-IP<sub>6</sub> に対する小麦由来フィターゼの脱リン酸活性が極めて低いという結果であった (Cosgrove 1966)。この結果は、*scyllo*-IP<sub>6</sub> が、植物や微生物に存在が認められているフィターゼによって分解されにくいと、土壌中に多量に蓄積していることを示唆している。しかし、近年得られた IP<sub>6</sub> の動態に関する知見から、土地利用形態によって *scyllo*-IP<sub>6</sub> が蓄積し、また分解されもするということが示された (Neal 2017)。

申請者も含め、様々な研究者が *myo*-IP<sub>6</sub> を効率的に分解可能な土壌微生物を特定してきたが、以下に記す技術的問題から、*scyllo*-IP<sub>6</sub> を効率的に分解可能な土壌微生物を特定することができずにいた。その理由としては、植物から抽出精製可能な *myo*-IP<sub>6</sub> と異なり、*scyllo*-IP<sub>6</sub> は有機化学合成する必要があるため極めて高価であり、*scyllo*-IP<sub>6</sub> を分解する能力の高い土壌微生物のスクリーニングのように、多量の試料を必要とする試験を行うことが困難であったことにある。しかし近年、*scyllo*-イノシトールが、アルツハイマー病に対する経口治療薬の候補として注目を集めた結果、合成スケールの拡大が図られ、試薬グレードの *scyllo*-イノシトールを安価 (1 gあたり1万円程度) に入手することが可能になった。そこで本研究では、市販の *scyllo*-イノシトールを購入し、これをリン酸化することで *scyllo*-IP<sub>6</sub> を合成することで、これまで困難であった *scyllo*-IP<sub>6</sub> の動態に関わる微生物学的要因の解明を行う。

本研究によって得られる成果は、これまで土壌中に多量に蓄積している事が示されていたが、その動態に関する知見が殆ど無かった、*scyllo*-IP<sub>6</sub> の土壌中における分解機序を世界で初めて明らかにできる。また、この成果は、中長期的にはリン酸質肥料の肥効改善につながる農法への寄与を通じ、リン施肥が抱える問題の解決にも貢献できる。

2. 研究の目的

IP<sub>6</sub> の動態に関する新たな知見 (右図に概要を記した) は、作物によるリン利用効

<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>myo-イノシトール6リン酸</b> (フィチン酸)</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p><b>scyllo-イノシトール6リン酸</b></p>  </div> </div>	
<p><b>植物体中</b></p> <p>リン酸の蓄積形態として存在が確認</p>	<p>存在は確認されていない</p>
<p><b>土壌中</b> イノシトールリン酸類は土壌有機態リン酸の主要成分 (~80% of Org-P in soil, 1000 µg-P / g-dry soil)</p>	
<p>イノシトールリン酸類の0~100% 植物遺体由来と考えられている</p>	<p>イノシトールリン酸類の0~100% その由来は未解明</p>
<p>フィターゼによって分解される</p>	<p>分解酵素は未知</p>

率を改善するために、*myo*-IP<sub>6</sub>と同様に *scy11o*-IP<sub>6</sub>の動態を明らかにする必要性を示している。しかし研究開始時点では、土壌に蓄積している *scy11o*-IP<sub>6</sub>について、その供給源も分解過程も明らかとなっていない。そのため、なぜ明確な供給源が明らかになっていない *scy11o*-IP<sub>6</sub>が、植物遺体として多量に供給される *myo*-IP<sub>6</sub>と同程度まで土壌中に蓄積しているのか、*scy11o*-IP<sub>6</sub>の供給源は何か、土壌種や土地利用形態によって *myo*-IP<sub>6</sub>と *scy11o*-IP<sub>6</sub>の蓄積傾向が異なるのはなぜか、*scy11o*-IP<sub>6</sub>が土壌中に蓄積することの生態学的意義はなんなのか、といった様々な学術的「問い」に対する答えの手がかりすら得られていない。そこで本研究では、*scy11o*-IP<sub>6</sub>に関する様々な学術的「問い」に対する答えを導き出す第一歩として、*scy11o*-IP<sub>6</sub>の分解を行う土壌中の分解者の正体は何か、*scy11o*-IP<sub>6</sub>の分解者はどのような環境で機能を果たすのか、*myo*-IP<sub>6</sub>と *scy11o*-IP<sub>6</sub>では分解機序がどのように異なるのか、という3つの学術的「問い」に対する答えを導き出すため、これまで未解明であった *scy11o*-IP<sub>6</sub>の動態に関わる微生物学的要因の解明を行った。

またこれまでの研究において、植物根圏土壌では *myo*-IP<sub>6</sub>等有機態リンの分解活性が高まることを示してきたように (Unno 2005, Unno 2013)、植物根圏は土壌中において有機態リンの分解活性が高い領域であると同時に土壌から植物へのリン供給という農業面からも重要な領域である。しかしこれまでは積極的に養分吸収が行われている根圏土壌を特定することが困難であったため、植物根近傍土壌全体を一つの根圏土壌として扱わざるを得なかった。近年になって根が根圏土壌に放出した分泌物をRI イメージング技術により可視化することが可能となり、植物が積極的に働きかけている根圏土壌を特定することが可能となった (Yin 2020)。そこで本研究では根圏イメージング技術を活用することで土壌のリン状態が植物の分泌物パターンにどのような影響を及ぼすかを評価した。

### 3. 研究の方法

本研究では、植物遺体として多量に供給される *myo*-IP<sub>6</sub>と、同程度までに土壌中に蓄積している *scy11o*-IP<sub>6</sub>の動態に関わる微生物学的要因の解明のため、

#### (1) *scy11o*-IP<sub>6</sub>を分解する能力の高い土壌細菌の単離同定、及び機能解析

を行うことで、土壌中における *scy11o*-IP<sub>6</sub>資化性細菌の分布と *scy11o*-IP<sub>6</sub>の動態解析を行った。さらに土壌から植物へのリン供給を行う上で重要な植物根圏における有機態リンの動態を評価するために

#### (2) 根圏イメージング技術による根圏土壌の採取及びその分析

を行った。

#### (1) *scy11o*-IP<sub>6</sub>を分解する能力の高い土壌微生物の単離同定、及び機能解析

本研究で使用する *scy11o*-IP<sub>6</sub>の作成においては、研究協力者であるスメソニアン熱帯研究所のTurner 博士から標品としての *scy11o*-IP<sub>6</sub>を提供頂き、これを標品としてNMR分析用いることで作成試料のクオリティチェックを行った。*scy11o*-IP<sub>6</sub>資化性細菌の単離同定については、*myo*-IP<sub>6</sub>資化性細菌の単離に用いたPhytate specific 培地を一部改変して用いた (Unno 2005)。供試土壌としては、広島大学3要素区のNPK施肥区及びNK施肥区、広島大学水田、及び北里大学草地土壌を用いた。広島大学3要素区のNPK施肥区は無機態リン含有率が高い土壌である一方で、NK施肥区は無機態リン含有率が低い土壌であり、無機態リン含有率が *scy11o*-IP<sub>6</sub>資化性細菌の分布に与える影響を評価するために採用した。広島大学水田も無機態リン含有率の高い土壌であり、広島大学3要素区のNPK施肥区と比較することで圃場管理法の違いが *scy11o*-IP<sub>6</sub>資化性細菌の分布に与える影響を評価するために採用した。一方で、北里大学草地土壌は他の土壌と比較して有機態リン含有率が高い土壌であり、有機態リン含有率の違いが *scy11o*-IP<sub>6</sub>資化性細菌の分布に与える影響を評価するために採用した。*scy11o*-IP<sub>6</sub>資化性細菌の機能解析については、資化性評価、IP<sub>6</sub>の分解特性解析、簡易同定、及びドラフトゲノムシーケンス解析を行った。IP<sub>6</sub>の分解特性解析は、PAGE法によって行った。

#### (2) 根圏イメージング技術による根圏土壌の採取及びその分析

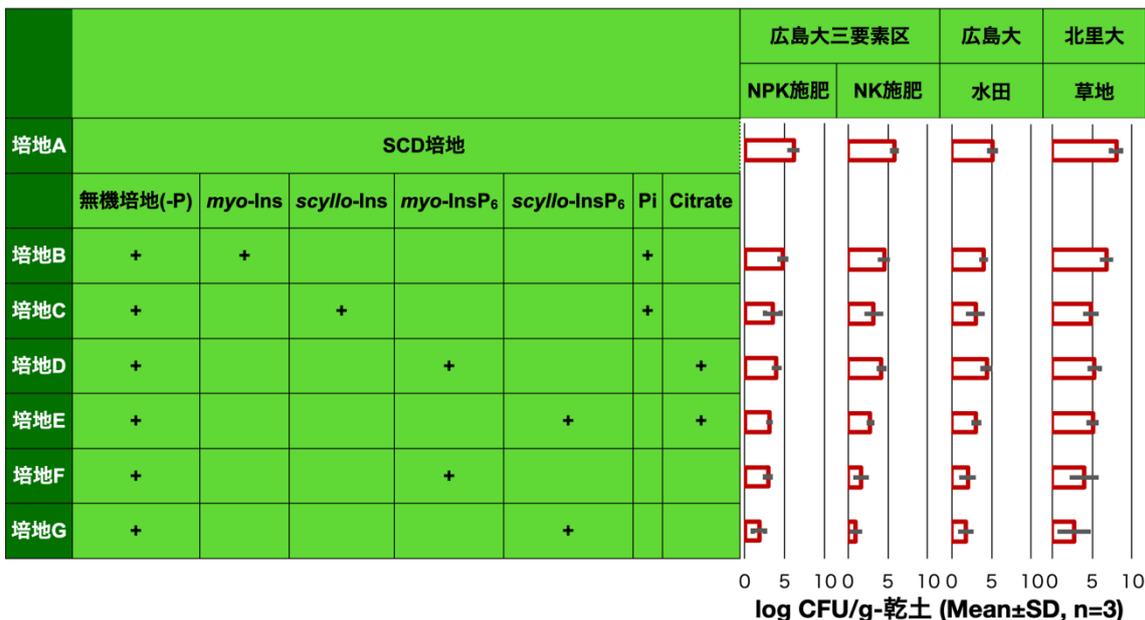
<sup>14</sup>C<sub>2</sub>とポジトロンイメージング技術を用いることで、有機物分泌活性が高い植物根とその影響下にある根圏土壌を特定することができる根圏イメージング技術をもちいることで、根圏土壌やバルク土壌を明確に定義できる。本研究では低リン土壌である広島大学3要素区NK施肥区土壌を用いて低リン条件とリンを増強した高リン条件を設計し、マメ科作物シロバナルーピンを栽培し、根圏イメージングを行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *scy11o*-IP<sub>6</sub>を分解する能力の高い土壌細菌の単離同定、及び機能解析

次ページに広島大学3要素区のNPK施肥区及びNK施肥区、広島大学水田、及び北里大学草地土壌を対象として行った資化性細菌の分布調査結果を示した。*scy11o*-IP<sub>6</sub>資化性細菌のコロニー形成単位は土地利用形態や施肥によって異なった。さらに *myo*-IP<sub>6</sub>資化性細菌と比較してのコロニー形成単位は1桁以上低かった。これらの結果は、IP<sub>6</sub>の土壌中における動態が土地利用形態や施肥によって異なることに加えて、光学異性体間でも異なることを示唆している。

これらの成果は、世界で初めて *scy110*-IP<sub>6</sub> 資化性細菌の分布を明らかにしたものである。また単離菌株を対象とした IP<sub>6</sub> の分解特性解析やドラフトシーケンスの結果から、既報の有機態リン分解酵素と異なる特徴をもった酵素群の存在が示されており、今後の研究においてこれらを明らかにしていくことにより、*scy110*-IP<sub>6</sub> 資化性細菌の生態的位置付けや応用微生物学的な発展も期待できると考えている。

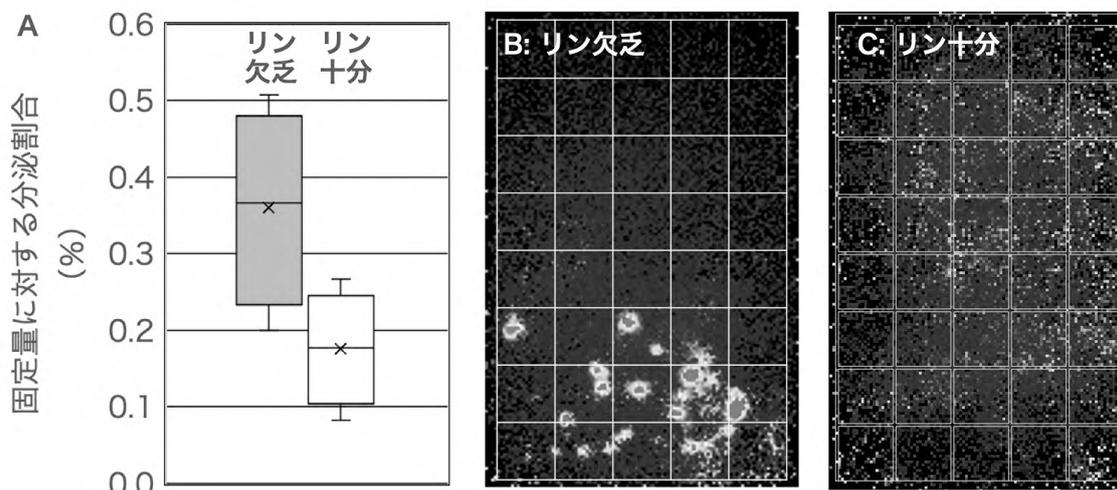


使用培地; Phytate specific broth 改変無機培地 (Unno et al., 2005)

供試土壌の全リン (mg-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg); NPK施肥区 639, NK施肥区 232, 水田 309, 草地 測定中  
CFU; コロニー形成単位, Ins; イノシトール, InsP<sub>6</sub>; イノシトール6リン酸, Pi; 無機リン酸

## (2) 根圏イメージング技術による根圏土壌の採取及びその分析

下図に根圏イメージング技術によって示されたシロバナルーピンのリン栄養状態が光合成産物の分泌割合とパターンに与える影響を示した。



A は C-11 光合成固定量に対する C-11 光合成産物の分泌割合 (n=4) を示しており、リン欠乏状態において同化直後の光合成産物の分泌割合が高まることが明らかになった。また B にはリン欠乏条件における根分泌物パターンを、C にはリン十分条件における根分泌物パターンを示した。これらの結果はリン欠乏状態では同化直後の光合成産物をスポット状に分泌する根圏領域が存在することを示している。これらの成果は、世界で初めて植物のリン栄養状態が初期光合成産物の分配に強く影響し、特定の根圏領域に集中して働きかけていることを示したものである。また採取した根圏土壌の分析結果から、根分泌活性が高い領域において土壌溶液中有機酸等の有機物濃度の増加や無機リン濃度の増加が示されており、こうした初期光合成産物の動態と植物によりリン獲得機構に密接な関係が存在することが示された。

さらに根分泌活性が高い領域において土壌蓄積型無機態リンの主要形態である鉄態リンの含有率が減少することが明らかとなった。このことは既存手法のように土壌全体や根圏土壌全体を対象としていては明らかにすることができなかった植物によるリン獲得能力の本質に、根圏イメージング技術を用いることで迫りうることを示している。またメタゲノム解析の結果、根分泌

活性が高い領域において存在割合が高まる Metagenome assembled genome としてアンモニア酸化古細菌である *Nitrosotalea* に分類されるものが抽出されるなど、根圏土壌微生物研究において新展開が期待できる非常に興味深い成果も得られた。

<引用文献>

1. Cheesman (2014) *Biogeosci.*, **11**, 6697
2. Cosgrove (1966) *J. Sci. Food Agric.* **17**, 550
3. Neal (2017) *Environ. Microbiol.*, **19**, 2740
4. Turner (2004) *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **68**, 802
5. Unno (2005) *Environ. Microbiol.* **7**, 396
6. Unno (2013) *Microb. Environ.* **28**, 120
7. Yin (2020) *Sci. Rep.* **10**, 8446

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 海野佑介	4. 巻 93
2. 論文標題 フィチン酸から探る土壌有機態リンの機能と動態	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 34-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20710/dojo.93.1_34	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 橋本 洋平、和崎 淳、谷 昌幸、海野 佑介、俵谷 圭太郎、佐藤 匠、丸山 隼人	4. 巻 90
2. 論文標題 リン最前線-分子から圃場レベルの土壌肥科学と植物栄養学の連携-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本土壌肥科学雑誌	6. 最初と最後の頁 230～235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20710/dojo.90.3_230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尹 永根、鈴井伸郎、三好悠太、海野佑介、丸山隼人、和崎 淳、菅あやね、圓尾明子、渡部敏裕、橋本洋平、内田翔子、信濃卓郎、河地有木
2. 発表標題 異なる土壌における白花ルーピンの根分泌物分布特性の可視化
3. 学会等名 日本土壌肥科学会2022年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海野 佑介、尹 永根、橋本洋平、和崎 淳
2. 発表標題 農耕地土壌から単離したイノシトールリン酸資化性細菌の特性調査
3. 学会等名 日本土壌肥科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海野 佑介, 尹永根, 橋本洋平, 和崎 淳
2. 発表標題 農耕地土壌におけるイノシトールリン酸資化性細菌の分布
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海野佑介, 尹 永根, 鈴木伸郎, 石井里美, 栗田圭輔, 三好悠太, 河地有木, 信濃卓郎
2. 発表標題 C-11ライブイメージングにより示された光合成産物の根からの分泌に対する根圏土壌の生化学的応答.
3. 学会等名 第50回記念根研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Unno, Yong-Gen Yin, Nobuo Suzui, Satomi Ishii, Keisuke Kurita, Yuta Miyoshi, Naoki Kawachi, Takuro Shinano
2. 発表標題 Response of soil microbial community to photosynthetic product secretion activity of plant roots: Adaptation of rhizosphere live imaging with <sup>11</sup> C-labeled photosynthetic products.
3. 学会等名 Rhizosphere 5 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海野 佑介
2. 発表標題 土壌蓄積リンの動態に関わる土壌細菌機能 -植物根圏土壌における話題を中心に-
3. 学会等名 日本土壌肥料学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	尹 永根  (Yin Yong-Gen)  (50609708)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・主任研究員   (82502)	
研究分担者	橋本 洋平  (Hashimoto Yohey)  (80436899)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授   (12605)	
研究分担者	和崎 淳  (Wasaki Jun)  (00374728)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授   (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------